



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 101 38 303 A 1**

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 35/64**

21 Aktenzeichen: 101 38 303.7  
22 Anmeldetag: 10. 8. 2001  
43 Offenlegungstag: 6. 3. 2003

DE 101 38 303 A 1

71 Anmelder:  
Aventis Pharma Deutschland GmbH, 65929  
Frankfurt, DE

72 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

56 Entgegenhaltungen:  
WO 01 31 033 A2  
Yang Zheng.: China-Science: House fly yields medicine, experts say. In: Inter Press Service (3.Sep. 1997). (abstract) NLDB [online]. [recherchiert am 11.04.2002]. In: Dielag. NLDB Accession No.97:314231 NLDB;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verwendung von Enzymisolaten aus Fliegenlarven zur Wundbehandlung

57 Die Erfindung betrifft die topische Applikation von Enzymen oder Enzymisolaten aus Fliegenlarven verschiedener Arten der Gattung *Lucilla* zur Behandlung von oberflächlichen oder tiefen chronischen und akuten Wunden jeglicher Genese.

DE 101 38 303 A 1

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die topische Applikation von Enzymen oder Enzymisolaten aus Fliegenlarven verschiedener Arten der Gattung *Lucilia* zur Behandlung von oberflächlichen oder tiefen chronischen und akuten Wunden jeglicher Genese.

[0002] Die Wundheilung ist ein komplexes Geschehen, bei dem multiple Zielzellen und Zielstrukturen in einer geordneten Abfolge von Prozessen ineinander greifen müssen. Unabhängig von der Wundart (chronisch/akut) laufen diese Prozesse ab, während die Zeitdauer einzelner Phasen variabel ist. Es lassen sich generell drei Hauptphasen unterscheiden, die exsudative Phase, die proliferative Phase und die Epithelisierung- bzw. Reparationsphase.

[0003] In der exsudativen Phase stehen die akute Traumatisierung der hämostaseologischen und vasokonstriktorischen Reaktionen im Vordergrund. Klinisch imponiert ein Wundödem und der Wundschmerz. Der entstandene Gefäßdefekt wird unter dem Einfluß der Thrombozyten verschlossen. Diese setzen chemotaktisch wirkende Thrombozyten frei. Es kommt zu einer Einwanderung von Makrophagen, Neutrophilen und Lymphozyten. Dadurch wird ein Phagozytosesystem aufgebaut, das hochwirksam für das Gewebedebridement verantwortlich ist.

[0004] Nach Beseitigung von Zelltrümmern beginnt durch die Migration von Fibroblasten und Gefäßendothelzellen die proliferative Phase. Der Zellgehalt nimmt durch die eingewanderten Fibroblasten und Endothelzellen massiv zu. Gleichzeitig werden vermehrt Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die ihrerseits die Gefäßneubildung und Zellproliferation stimulieren. Zusätzlich findet in dieser Phase ein Matrixumbau statt. Dies erfolgt durch die Bildung und den Umbau von Kollagen Typ III in Kollagen Typ I. Dadurch entsteht ein gut kapillarisiertes, Makrophagen-, Fibroblasten- und Mastzellreiches Granulationsgewebe.

[0005] An diese proliferative Phase schließt sich die Epithelisierungs- und Reparationsphase an. In dieser abschließenden Phase kommt es zur Wundkontraktion und zur Migration randständiger Keratinozyten in die Wunde. Die Neoangiogenese und die Kapillardichte nimmt ab. Der Kollagengehalt hingegen nimmt zu. Dieser Prozeß ist für die mechanische Festigkeit des entstehenden Narbengewebes relevant.

[0006] Bei Störungen dieser komplexen Wechselwirkungen können Verzögerungen der Wundheilung auftreten. In Abhängigkeit von der Genese der beeinträchtigten Prozesse spricht man nach einer 6-8 Wochen lang bestehenden Wunde von chronischen Wundheilungsstörungen. Diese treten bei einer Vielzahl von immunologisch bedingten Erkrankungen, der Varikose, der arteriellen Verschlusskrankung, nach Infektionen und beispielsweise beim Diabetes mellitus auf. Maßnahmen zur Förderung der Wundheilung dienen der beschleunigten oder regelrechten Abfolge der zuvor beschriebenen Prozesse. Hierbei sind in erster Linie wundreinigende, neben granulationsfördernden Verfahren anzuführen. Durch moderne "Wunddressings" kann aber auch die Epithelisierung gefördert werden. Eine der Hauptursachen der verzögerten Wundheilung liegt in der mangelnden Formation von Granulationsgewebe. Dies kann entweder durch vermindertes endogenes Wunddebridement verursacht sein, oder es kommt in Folge von Infektionen, Durchblutungsstörungen, immunologischen Erkrankungen zu einer überschüssigen Bildung von Zell- und Gewebedetritus.

[0007] Therapeutisch kommen hierbei wundreinigende Maßnahmen zum Einsatz.

[0008] Ziel der Reinigung ist die Herstellung eines sauberen Wundgrundes. Dazu müssen zunächst Salbenreste und

Krusten beseitigt und eventuell vorhandene Nekrosen abgetragen werden. Letzteres geschieht entweder chirurgisch mit dem scharfen Löffel (Kürrettage) und mit Pinzette und Schere. Alternativ kann man enzymatische Salben verwenden, die vorzugsweise denaturiertes Protein abbauen. Sie enthalten Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Enzyme aus bovinem Material wie Pankreasenzyme, oder Kollagenase, Fibrolysin, Streptokinase oder Kälberblutdysilate. Parallel hierzu erfolgt die regelmäßige Desinfektion beispielsweise mit Kaliumpermanganat oder mit Rivanol®-Bädern. Desinfizierende Maßnahmen können auch mit Silber- oder mit jodhaltigen Präparationen durchgeführt werden.

[0009] Die enzymatischen Präparate zeigen allerdings am Patienten häufig nur eine eingeschränkte Wirksamkeit.

15 Denn die Dosierung des Enzyms ist häufig sehr niedrig und die Halbwertszeit der bekannten Enzympräparate liegt bei 6 bis 12 Stunden. Aus diesem Grund sind tägliche, auch mehrmalige Verbandswechsel notwendig. Einige der Präparate sind Kombinationspräparate mit topisch applizierbaren Antibiotika. Der Nachteil der Kombinationspräparate liegt in der Gefahr einer epikutanen Sensibilisierung. Fast 60-70% der Patienten mit chronischen Ulzera crurum leiden an einer oder mehreren Sensibilisierungen auf Salbengrundlagen oder anderen Bestandteilen topischer Externa.

25 [0010] Daher sollte auf den Einsatz lokaler Antibiotika verzichtet werden, da zum einen die Resistenzentwicklung, zum anderen die Sensibilisierungsrate hoch ist.

[0011] Ferner ist die Anlegung von Larven (Maden) der Art *Lucilia sericata* auf Wunden bekannt. Diese Therapie basiert auf uralten volksmedizinischen und teilweise auf kriegsmedizinischen Erkenntnissen und Beobachtungen über die Verunreinigung von Kriegsverletzungen mit Fliegenmaden. Die Maden dieser Art ernähren sich ausschließlich von nekrotischem Gewebe. Dabei wird dieses Material durch Sekretion von Speichel gleichsam vorverdaut und danach erst von der Made aufgenommen. Es kommt keinesfalls zu einer aktiven Nahrungsaufnahme durch die Maden der *L. sericata* im Sinne eines Kau- oder Beißaktes. Dadurch ist sichergestellt, daß die Maden nicht in andere Körperbereiche oder in nicht-betroffene Körperhöhlen eindringen können. Die Madentherapie zeigt sehr hohe therapeutische Effektivität. Allerdings ist die gegenwärtige Behandlungsmethode extrem kompliziert, kostenaufwendig und bedarf eines hohen logistischen Aufwandes. Für die Anwendung am Menschen sind die Maden unter kontrollierten Bedingungen zu züchten. Sowohl für die Aufzucht als auch für den Transport vom Labor zum Patienten ist Keimfreiheit zu gewährleisten. Die therapeutische Effektivität ist nicht zu dosieren. Zwar ist es möglich die Anzahl der Maden zu bestimmen, die auf die Wunde aufgebracht wird, nicht aber die von ihnen erbrachte enzymatische Wirksamkeit. Die Maden selber unterliegen einem biologischen Entwicklungsablauf, an dessen Ende die Metamorphose der Larve zur Puppe und danach zur Fliege steht. Aus diesem Grund ist die Applikation der Larven engmaschig zu wiederholen. Für Patienten und medizinische Leistungserbringer ist eine hohe Compliance erforderlich, um die Therapie durchzuführen, da kulturelle und zivilisatorische Grenzen psychologisch überwunden werden müssen. Zudem kann das Einhaken der Mundhaken der Larven recht schmerzhaft sein.

60 [0012] In dem Bestreben, wirksame Behandlungsverfahren für oberflächliche oder tiefe chronische und akute Wunden jeglicher Genese zu finden, wurde nun gefunden, dass die erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate aus Fliegenlarven verschiedener Arten der Gattung *Lucilia* die genannten Nachteile beheben können.

[0013] Die erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate stellen eine deutliche Weiterentwicklung der Madenthe-

rapie hinsichtlich der Applikation und Dosierung dar. Durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität kann die Therapie besser gesteuert werden. Als Fertigpräparat besitzen die Enzympräparate eine kontinuierliche Leistungsfähigkeit, die nicht vom Entwicklungszyklus der Maden abhängt. [0014] Die Erfindung betrifft daher Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung, erhältlich aus Fliegenlarven der Gattung *Lucilia*.

[0015] Geeignete Arten aus der Gattung *Lucilia* sind beispielsweise *Lucilia sericata*, *Lucilia sarcophaga* und *Sarcophaga carnaria*. Die Gattung *Lucilia* ist ubiquitär vorhanden und ein Fachmann kann diese Insekten leicht auffinden, beispielsweise durch Auslegen von frischem Fleisch.

[0016] Die Erfindung betrifft ferner Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung, erhältlich aus 5 bis 8 Tagen alten Fliegenlarven der Gattung *Lucilia*. Dabei beginnt die Zeitrechnung mit dem Schlüpfen der Larven aus dem Ei.

[0017] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung der Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung, das durch gekennzeichnet ist, dass die Larven der Gattung *Lucilia* vor der Verpuppung getötet und homogenisiert werden, und das erhaltene Homogenisat wird anschließend von nicht gelösten Bestandteilen befreit und die löslichen Bestandteile werden konserviert.

[0018] Die Homogenisierung erfolgt beispielsweise durch Ultraschall oder durch mechanische Homogenisierung. Die Larven können vor der Homogenisierung geteilt werden, in einen vorderen Kopfteil und in einen hinteren Körperteil. Die Trennung des Homogenisats in feste und lösliche Bestandteile erfolgt beispielsweise durch Filtration oder Zentrifugation. Die Konservierung der Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung erfolgt durch Kühlung während des gesamten Verfahrens und Einfrieren der erhaltenen löslichen Homogenisate oder durch Gefriertrocknung. Ferner können weitere bekannte Mittel zur Stabilisierung von Enzymen oder Enzymisolate eingesetzt werden wie Puffer, Proteaseinhibitoren oder Salze.

[0019] Die Herstellung der erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate erfolgt beispielsweise dadurch, dass Eier oder Larven der Arten *Lucilia sericata* und *Sarcophaga carnaria* auf frischem Fleisch gehalten werden. Die Larven wachsen und gedeihen auf dem Fleisch und werden kurz vor Eintritt in das Verpuppungsstadium geerntet. Vorteilhaft ist dabei die Larven in der Zeit von Tag 5 bis Tag 8 nach dem Schlüpfen aus dem Ei zu ernten.

[0020] Die Larven werden dazu zunächst äußerlich weitgehend keimfrei gemacht. Dies erfolgt durch mehrere Waschschrte in aseptischen Lösungen in absteigender Konzentration. In den letzten Waschschrten wird sterilisierte NaCl-Lösung eingesetzt und dadurch eine weitgehende äußere Keimfreiheit der Larven hergestellt. Danach werden die Larven dekapitiert, d. h. das vordere Drittel wird vom Rest des Larvenkörpers abgetrennt. Beide Larventeile werden sofort getrennt in einem Trägermedium auf Eis asserviert. Das Trägermedium kann entweder wässriger oder hydrophober Natur sein. Geeignete Trägermedien sind beispielsweise sterile physiologische Kochsalzlösung, Puffer, sterile Elektrolytlösungen, Albuminlösungen, aber auch tierische und pflanzliche Öle, ölige Lösungen, Fette, beispielsweise Vaseline, Wollwachse, Wollwachsalkohole, Kakao- 60 butter oder Paraffine.

[0021] Danach werden die Larventeile homogenisiert. Dies geschieht in mehreren Schritten mittels Ultraschallhomogenisatoren und/oder mechanischen Homogenisatoren. Die Homogenisierungsschritte erfolgen bei ständiger Kühlung von etwa 4°C Celsius. Die Homogenisierung erfolgt in dem zuvor verwendeten Trägermedium.

[0022] Nach Erhalt der homogenen Flüssigkeit wird der

Extrakt steril filtriert, beispielsweise mit einem Filter der einen Porendurchmesser von 0,1 bis 0,4 µm. Im letzten Schritt wird der Extrakt aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgt bei einer Temperatur von etwa -21°C bis -80°C.

[0023] Die erhaltenen steriltfiltrierten Extrakte können auch lyophilisiert werden.

[0024] Die erfindungsgemäßen Extrakte können auch mit üblichen Reinigungsmethoden weiter gereinigt oder fraktioniert werden wie Chromatographie, Hochdruckflüssigkeitsschromatographie (HPLC), Säulenchromatographie, Salz-fällungen oder Elektrophorese.

[0025] Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an den erfindungsgemäßen Enzymen oder Enzymisolaten mit wundheilender Wirkung zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

[0026] Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate zur Therapie von oberflächlichen oder tiefen chronischen und akuten Wunden jeglicher Genese.

[0027] Unter dem Begriff "chronische und akute Wunden jeglicher Genese" werden beispielsweise Wunden verstanden wie Operationswunden, die gezielt oder ungewollt sekundär heilen sollen, Schnitt-, Stich-, Schürf-, Biß-, Brand-, oder Schussverletzungen, und andere Wunden, die nicht primär mittels chirurgischer Naht oder einem primären Wundverschluß behandelt werden können. Ferner sind mit dem Begriff der akuten Wunden, alle Wunden gemeint, die durch eine Superinfektion nicht primär abheilen können und alle Wunden, deren Manifestation 4 Wochen und weniger beträgt. Chronische Wunden sind alle Verletzungen, die mit der Aufhebung der Integrität des Epithels einhergehen und länger als 4 Wochen manifest sind. Insbesondere sind hiermit schlecht heilende Wunden auf der Basis eines Diabetes mellitus, einer Varikose oder einer Venenthrombose, eines rheumatischen Leidens, einer Vaskulitis, einer arteriellen Verschlusskrankheit, eines Leidens der Lymphgefäße, hämatologischer Erkrankungen und unter oder nach Infektionen der Wunden gemeint.

[0028] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet, dass man die erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

[0029] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Therapie von oberflächlichen oder tiefen chronischen und akuten Wunden jeglicher Genese.

[0030] Die Applikation der erfindungsgemäßen Arzneimittel erfolgt in der Regel topisch.

[0031] Geeignete pharmazeutische Zusammensetzungen für die topische Anwendung auf der Haut liegen vorzugsweise als Salbe, Lösung, Suspension, Creme, Puder, liposomalen oder oleosomalen Formulierungen, Gel, Lotion, Paste, Spray, Aerosol oder Öl vor. Als Träger können Vaseline, Lanolin, Polyethylenglycole, Alkohole und Kombinationen von zwei oder mehreren dieser Substanzen verwendet werden. Die erfindungsgemäßen Enzyme oder Enzymisolate sind im allgemeinen in einer Konzentration von 0,1 Gew.-% bis 100 Gew.-% der Zusammensetzung vorhanden, beispielsweise von 1,0 Gew.-% bis 60 Gew.-%.

[0032] Auch eine transdermale Verabreichung ist möglich. Geeignete pharmazeutische Zusammensetzungen für

BNSDOCID: <DE\_10138303A1\_1\_>

- durch gekennzeichnet, dass sie aus den Arten *Lucilia sericata*, *Lucilia sarcophaga* oder *Sarcophaga carnaria* stammen.
3. Enzyme oder Enzymisolate gemäß der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus 5 bis 8 Tage alten Fliegenlarven stammen. 5
4. Verfahren zur Herstellung der Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, durch gekennzeichnet, dass Larven der Gattung *Lucilia* vor der Verpupung getötet und homogenisiert werden, das erhaltene Homogenisat anschließend von nicht gelösten Bestandteilen befreit wird und die löslichen Bestandteile konserviert werden. 10
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass 5 bis 8 Tage alte Fliegenlarven eingestzt werden. 15
6. Verfahren gemäß der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Homogenisierung mechanisch oder durch Ultraschall erfolgt. 20
7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 6, durch gekennzeichnet, dass die Trennung von unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation oder Filtration erfolgt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass eine Sterilfiltration mit einem Filter mit einem Porendurchmesser von 0,1 µm bis 0,4 µm erfolgt. 25
9. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an den erfindungsgemäßen Enzymen oder Enzymisolaten mit wundheilender Wirkung gemäß der Ansprüche 1 bis 3 zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff. 30
10. Verwendung der Enzyme oder Enzymisolate mit wundheilender Wirkung gemäß der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Therapie von oberflächlichen oder tiefen chronischen und akuten Wunden jeglicher Genese. 35
11. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine galenische Zusammensetzung zur topischen Anwendung auf der Haut eingesetzt wird, wie Salbe, Lösung, Suspension, Creme, Puder, liposomalen oder oleosomalen Formulierungen, Gel, Lotion, Paste, Spray, Aerosol oder Öl. 40 45
12. Verwendung gemäß der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme oder Enzymisolate in einer Konzentration von 0,1 Gew.-% bis 100 Gew.-% in der galenischen Zusammensetzung eingesetzt werden. 50
13. Verwendung gemäß Anspruch 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme oder Enzymisolate gemäß der Ansprüche 1 bis 3 in einer Konzentration von 1,0 Gew.-% bis 60 Gew.-% in der galenischen Zusammensetzung eingesetzt werden. 55
14. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine galenische Zusammensetzung für transdermale Anwendungen als Pflaster vorliegen. 60
15. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme oder Enzymisolate gemäß der Ansprüche 1 bis 3 in einer Wundauflagen aus Gaze, aus Alginaten, aus hydrokolloidalen Materialien, Schaumstoffen oder Silikonauflagen, die jeweils mit diesen Enzymen oder Enzymisolaten beschichtet, oder getränkt sind, vorliegen. 65
16. Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Enzyme oder Enzymisolate gemäß der Ansprüche 1 bis 3 in galenischen Zubereitun-

gen eingesetzt werden, die die Enzyme in inaktiver Form enthalten und die dann in oder auf die Wunde aufgetragen werden und durch Zugabe von spezifischen Substanzen aktiviert werden.

- Leerseite -